

На правах рукописи



ШИРИНКИНА Наталья Васильевна

**ФАКТОРЫ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ПОКАЗАТЕЛИ
ИММУННОГО ОТВЕТА И ТАКТИКА ИММУНОКОРРЕКЦИИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ**

14.00.36 Аллергология и иммунология

03.00.07 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Пермь - 2003

Работа выполнена в научно-производственной лаборатории
хламидийных препаратов ФГУП «Пермское НПО «Биомед»

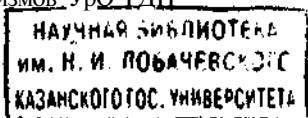
Научный руководитель: доктор медицинских наук **Тимашева О.А.**

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ **Кеворков Н.Н.**
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник **Маслов Ю.Н.**

Ведущая организация Челябинская государственная медицинская
академия

Защита состоится «23» июня 2003 г. в 12 часов на заседании
диссертационного совета Д 004.019.01 в Институте экологии и генетики
микроорганизмов УрО РАН по адресу: 614081, г.Пермь, ул.Голева, 13.
Факс (3422) 446711.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии
и генетики микроорганизмов УрО РДН



Автореферат разослан «23» мая 2003 г.

* 0 1 1 1 9 *

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор

 **Ившина И.Б.**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы определяется широким распространением и прогрессирующим увеличением удельного веса инфекций хламидийной этиологии у людей и животных (Герасимова и др., 2000; Четвертных, 2001). Установлено, что благодаря уникальным биологическим свойствам представители порядка *Chlamydiales* способствуют развитию заболеваний, различаемых по патогенезу и формам клинических проявлений - в зависимости от баланса взаимодействия в системе «паразит - хозяин» (Маилян, 2000). Вместе с тем, преобладающим явлением в эпидемиологии хламидиозов является формирование персистентных инфекций, характеризующихся хроническим течением с латентным пассированием возбудителя в организме хозяина, что, как правило, обусловлено снижением функциональной активности иммунной системы последнего и сопровождается длительными субклиническими проявлениями (Шаткин, Мавров, 1990; Гомберг и др., 1997; Братина и др., 1998; Анкирская, 1999). Отсутствие клинической манифестации, в свою очередь, затрудняет диагностику и лечение таких больных, в результате чего они становятся резервуаром возбудителя в популяции. При определенных условиях локальный патологический процесс может эволюционировать в генерализованный, обуславливая развитие различных осложнений, в том числе и со стороны иммунной системы (Анкирская, 1999; Маилян, 2000; Rank *et al.*, 2000). В связи с этим изучение иммунопатогенеза хламидиозов приобретает особую значимость. Анализ имеющейся весьма ограниченной научной информации свидетельствует о том, что в ответ на инфицирование хламидиями макроорганизм включает ряд механизмов как гуморального, так и клеточного иммунного ответа (Шаткин, Мавров, 1983; Бортничук, 1991; Глазкова, Герасимова, 1998, 1999; Miral *et al.*, 1996; Mazzoli, 1997; Shaw *et al.*, 2002). Однако до сих пор не определены роль и значение гуморальных факторов естественной (лизозим, тромбоцитарный катионный белок, комплемент) и специфической резистентности организма, не изучена взаимосвязь их изменений с динамикой клеточного иммунного ответа. Обращает на себя внимание также неоднозначная оценка влияния патогена на функциональную активность фагоцитарного, В- и Т-клеточного звеньев иммунной системы. Отсутствуют четкие иммунологические критерии формирования того или иного варианта течения и исхода хламидиозов. Это, в свою очередь, снижает эффективность традиционной этиотропной терапии. Отмечено (Горовиц и др., 1982; Хачикян, 1990; Якубович, 2000), что в отсутствии адекватной иммунокоррекции антибиотики могут способствовать дальнейшему подавлению функций системы иммунобиологического надзора. В последние годы с целью повышения эффективности антибиотикотерапии хламидиозов все чаще используют иммунокорректирующие препараты. Однако их выбор зачастую базируется на результатах изучения иммунопатогенеза иных

внутриклеточных инфекций как бактериальной, так и вирусной этиологии. При этом не учитывается дуализм биологических свойств хламидий (наличие одновременно признаков и грамотрицательных бактерий, и вирусов), стадии их жизненного цикла и баланс взаимодействия в системе «паразит - хозяин».

По данным большинства исследователей, хламидий стимулируют поликлональный гуморальный иммунный ответ и оказывают супрессирующее действие на Т-клеточное и фагоцитарное звенья, в силу этого выбор средств иммунокорректирующей терапии ограничивают препаратами пептидов тимуса, интерферонов и их миметиков (Хачикян, 1990; Делекторский и др., 1993; Сорокина и др., 1998; Бочкарев, Сергеев, 2000). Вместе с тем, отсутствие сведений о влиянии указанных соединений на основные патогенетические звенья хламидиозов свидетельствует о необходимости научного обоснования их применения. Вопросы регуляции В-звена иммунной системы у больных хламидиозами в настоящее время не разработаны. Исследование спектра действия ганглиина, полученного из ганглиев кальмаров и обладающего модулирующим влиянием на В-клеточное и макрофагальное звенья (Казьянин и др., 2000), при хламидиозах, которые, как известно, сопровождаются феноменом «антителозависимой экспансии микроорганизмов», представляется весьма перспективным.

Неоспоримо, что углубленное изучение патогенеза и иммунорегуляции при инфекциях хламидийной этиологии может способствовать решению многих аспектов проблемы, прежде всего, оптимизации этиопатогенетического лечения и реабилитационного периода. В связи с этим наиболее перспективными представляются экспериментальные исследования, касающиеся оценки состояния факторов естественной и специфической резистентности организма хозяина в процессе формирования различных вариантов течения хламидиоза, спектра и эффективности специфической и иммуномодулирующей терапии, определения оптимальных комбинаций, доз и способов введения лечебно-профилактических средств.

Цель настоящего исследования – комплексное изучение показателей естественной резистентности и иммунного ответа организма при экспериментальной хламидийной инфекции, а также определение тактики иммунокорректирующей терапии в условиях данной патологии.

Основные задачи исследования

1. Разработать модели воспроизведения различных вариантов течения хламидиоза.
2. Изучить динамику показателей естественной резистентности подопытных животных при экспериментальном хламидиозе.
3. Исследовать основные показатели гуморального и клеточного иммунного ответа при экспериментальном хламидиозе.

4. Изучить влияние иммуномодуляторов Тактивина и ганглиина на естественные и специфические механизмы защиты в условиях развития экспериментальной хламидийной инфекции.

Научная новизна исследования. Разработаны модели воспроизведения различных вариантов течения хламидийной инфекции. Показано, что внутрибрюшинная инокуляция морским свинкам *Chlamydomphila psittaci* штамма *Lory* индуцирует развитие острой (10^4 LDso), хронической (10^3 - 10^2 LDso) и латентной (10^1 LDjo) форм хламидиоза. В сравнительном аспекте впервые изучена динамика гуморальных и клеточных факторов естественной и специфической резистентности организма, в частности, лизоцима, тромбоцитарного катионного белка, комплемента, хламидийных антител, циркулирующих иммунных комплексов, фагоцитарной активности лейкоцитов крови (нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и суммарной), микробицидного потенциала фагоцитов в НСТ-тесте, числа Е-розеткообразующих клеток в условиях модельной хламидийной инфекции. С использованием методов иммунологического и патоморфологического исследования выявлены механизмы супрессии различных звеньев иммунной системы и персистенции хламидий. Предложен алгоритм оценки иммунного статуса при хламидийной инфекции. Определены иммунологические критерии, характеризующие различные варианты течения хламидиоза, позволяющие прогнозировать исход заболевания, а также своевременное использование адекватных иммунокорригирующих препаратов для нивелирования повреждающих эффектов хламидий. Впервые в условиях экспериментальной хламидийной инфекции исследована иммуномодулирующая активность Тактивина, ганглиина и оценена эффективность их включения в схему комплексного лечения данной патологии. Предложены рациональные схемы иммунокоррекции персистирующей хламидийной инфекции с использованием данных иммуномодуляторов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Внутрибрюшинное заражение морских свинок овокультурой *Chlamydomphila psittaci* индуцирует развитие генерализованного инфекционного процесса в виде острой (10^4 LDso), хронической (10^3 - 10^2 LDso) и латентной (10^1 LDJO) форм. Степень истощения и склерозирования лимфоидной ткани зависит от дозы патогена.

2. Комплексное изучение показателей основных гуморальных факторов естественной и специфической резистентности организма, функций и резервной емкости фагоцитов в стимулированных вариантах фагоцитарного и НСТ-теста при хламидиозе позволяет прогнозировать характер течения заболевания, формирование иммуносупрессии соответствующих звеньев и определять тактику иммунокорригирующей терапии.

3. Факторы естественной резистентности организма способствуют активации фагоцитарных реакций лейкоцитов в течение первых жизненных циклов хламидий. Их недостаточность обуславливает угнетение микробицидных функций фагоцитов, диссеминацию возбудителя и стимуляцию гуморального иммунного ответа, в частности, выработку антител-опсоинов. Начиная с 14-х суток после заражения, фагоцитарная активность лейкоцитов приобретает специфический характер, что обусловлено вовлечением эффекторов клеточного иммунитета.

4. Применение Тактивина и ганпшина перспективно для иммунокоррекции хламидийной инфекции. Учитывая различные механизмы их воздействия на фагоцитарную активность лейкоцитов и процесс антителообразования, целесообразно дифференцированное использование данных иммуномодуляторов при хламидиозах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют представление об иммунопатогенезе хламидиозов, механизмах формирования вторичного иммунодефицитного состояния и персистенции возбудителя. Предложенный алгоритм оценки иммунного статуса, апробированный на экспериментально зараженных животных, может быть использован в клинической практике, в частности, для анализа состояния факторов естественной и специфической резистентности организма, а также определения тактики этиопатогенетического лечения больных с заболеваниями хламидийной этиологии. Полученные экспериментальные данные о целесообразности применения иммуномодуляторов для купирования хламидийной инфекции могут быть использованы в клинической практике для оптимизации лечения больных хламидиозами.

Материалы диссертации используются в курсе лекций и практических занятий кафедр гистологии, микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, а также факультета усовершенствования врачей Пермской государственной медицинской академии.

Апробация работы и публикации. Материалы исследований доложены и обсуждены на Научно-практической конференции молодых ученых Пермской государственной медицинской академии, посвященной памяти академика РАМН Е.А. Вагнера (Пермь, 1998); Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов», посвященной 95-летию Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова ГУЛ «Иммунопрепарат» (Уфа, 2000); Пленарных заседаниях Пермского филиала Всероссийского научно-практического общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов (2000, 2001); Международной научной конференции «Перспективы развития естественных наук в высшей школе» в Естественно-научном институте при Пермском государственном университете (Пермь, 2001);

Всероссийской конференции «Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в 21 веке», посвященной 105-летию Пермского НИИ вакцин и сывороток ФГУП «Пермское НПО «Биомед» (Пермь, 2003).

По теме диссертации опубликовано 7 работ.

Связь работы с научными программами. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР НИИ вакцин и сывороток ФГУП «Пермское НПО «Биомед» (номер государственной регистрации темы 01.9.80 007824), гистологический фрагмент исследований - при участии сотрудников кафедры гистологии Пермской государственной медицинской академии (зав. кафедрой - профессор, д.м.н. Четвертных В.А.).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов исследования, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов. Указатель литературы содержит 259 источников: из них 105 отечественных и 154 иностранных авторов. Работа изложена на 234 страницах машинописного текста, включая 52 таблицы, 32 рисунка, в том числе 12 микрофотографий.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на 132 морских свинках массой 250–400 г, 840 аутбредных белых мышках весом 6–8 г, а также 500 развивающихся куриных эмбрионах от кур породы Леггорн. Хламидийную инфекцию воспроизводили на морских свинках путем внутрибрюшинного инокулирования 10% взвесей очищенных овокультур возбудителя, содержащих 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 LD₅₀ в 0,03 мл для белых мышей при интрацеребральном заражении в расчетном объеме. В соответствии с этими дозами инфекта 40 опытных морских свинок распределяли на четыре равноценные группы по 10 в каждой. Развитие инфекционного процесса у экспериментальных животных каждой группы подтверждали индикацией возбудителя в органах (брыжеечных и подчелюстных лимфатических узлах, тимусе, селезенке, печени, легких, почках, надпочечниках) на 4, 7, 14, 21 и 28-е сутки после заражения с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и биологического метода. Параллельно проводили изучение патоморфологических изменений в указанных органах и клетках крови. В качестве контрольных препаратов использовали органы и кровь интактных морских свинок, находившихся в равных с опытными животными условиях питания и содержания. В серии специальных экспериментов у 20 морских свинок, зараженных дозами инфекта 10^4 LD₅₀ (условно-высокой) и 10^2 LD₅₀ (условно-низкой), исследовали динамику факторов естественной и специфической резистентности организма. В соответствии с указанными дозами опытных животных распределяли на две равноценные

группы по 10 в каждой. В качестве контроля служили интактные морские свинки с регулярными интракардиальными заборами крови (группа плацебо) и животные, которым вводили 10% взвеси контрольных желточных мешков куриных эмбрионов в разведениях, соответствующих таковым для инфицированных. Контрольных животных распределяли на три равноценные группы по 7 в каждой.

Коррекцию иммунологических дефектов на фоне экспериментального хламидиоза проводили в модельном эксперименте с помощью препаратов Тактивина (Московское АО «Биомед» им. И.И. Мечникова) или ганглиина (ФГУП «Пермское НПО «Биомед»). В первой серии опытов 30 морских свинок (три равноценные группы по 10 в каждой) примировали овокультурой хламидии в дозе 10^2 LD₅₀. Группа 1 служила контролем. Морские свинки из группы 2 на фоне хламидийной инфекции получали ганглиин (внутримышечно из расчета 20 мкг/кг), животные из группы 3 - Тактивин (подкожно из расчета 3 мкг/кг). Препараты вводили, начиная с 11-х суток после заражения, по схеме: 3 инъекции с интервалом 24 ч и 7 - с интервалом 48 ч (всего 10 доз). Во второй серии опытов у 20 морских свинок (две равноценные группы по 10 в каждой) исследовали влияние предварительного 3-кратного введения иммуномодуляторов на развитие экспериментального хламидиоза. За трое суток до заражения животные из группы 4 получали инъекции ганглиина, а животные из группы 5 - Тактивина. Дозы и пути введения иммуномодуляторов до и после заражения были такие же, как в первой серии опытов.

Объектами исследования служили желточные мешки куриных эмбрионов, мозговая ткань белых мышей, органы (брыжеечные и подчелюстные лимфатические узлы, тимус, селезенка, печень, легкое, почка, надпочечник) и кровь морских свинок (цельная, лейкомаасса и сыворотка). Желточные мешки куриных эмбрионов использовали для культивирования хламидий, получения хламидийных и контрольных антигенов для приготовления диагностикумов и примирования белых мышей и морских свинок. Мозговую ткань от белых мышей забирали после их гибели или усыпления хлороформом на 4-10-е сутки после заражения и использовали для индикации и выделения хламидии из органов морских свинок биологическим методом. Органы морских свинок забирали после их предварительного усыпления с помощью хлороформа на 4, 7, 14, 21, 28 и 60-е сутки после заражения и использовали для подтверждения развития экспериментального хламидиоза: индикации возбудителя и оценки патоморфологических изменений. Индикацию хламидии в субстратах (мазках-отпечатках от желточных мешков куриных эмбрионов, мозговой ткани мышей и органов морских свинок) осуществляли с помощью РНИФ и биологического метода. Кровь морских свинок получали путем пункции сердца в объеме 3-4 мл и использовали для изучения иммунологических показателей. В цельной крови непосредственно после ее забора

определяли СОЭ, общее число эритроцитов и лейкоцитов по общепринятым методикам. В мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе, оценивали наличие или отсутствие цитоплазматических включений хламидий, патоморфологических дефектов клеток, содержание различных популяций лейкоцитов. Гепаринизированную кровь (1,5-2 мл цельной крови обрабатывали раствором гепарина из расчета 50 ЕД/мл) использовали для оценки показателей фагоцитарной активности лейкоцитов, микробицидного потенциала фагоцитов в НСТ-тесте и получения лейкомаксы. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографина, дважды отмывали в среде 199 при 250g в течение 10 мин, стандартизовали до концентрации 5×10^6 кл/мл и использовали для постановки реакции Е-розеткообразования с эритроцитами кролика. Жизнеспособность клеток проверяли с помощью 0,1% раствора трипанового синего. Для изучения динамики гуморальных факторов иммунорезистентности использовали сыворотку, которую получали путем инкубирования нативной крови при 37°C в течение 30 мин и центрифугирования при 250g в течение 15 мин. Состояние гуморальных факторов естественной резистентности организма оценивали с помощью нефелометрических вариантов литических тестов: лизоцима - в отношении суточных культур *Micrococcus lysodeikticus* (Бухарин, Васильев, 1974), тромбоцитарного катионного белка - *Bacillus subtilis* (Бухарин, Васильев, 1977), комплемента - эритроцитов барана, сенсibilизированных кроличьей гемолитической сывороткой, согласно рекомендациям Е.У. Пастера и др. (1989). Для изучения гуморального иммунного ответа использовали комплекс односторонних серологических реакций, которые ставили и оценивали согласно инструкциям, прилагаемым к препаратам, производимым в ФГУП «Пермское НПО «Биомед», а также метод полиэтиленгликоль-осаждения для оценки уровня циркулирующих иммунных комплексов (Гриневиц, Алферов, 1981). Клеточный иммунный ответ оценивали по динамике показателей фагоцитарной активности лейкоцитов крови в отношении контрольного и хламидийного эритроцитарных диагностикумов (Каплин, 1993), спектрофотометрического варианта НСТ-теста (Гордиенко, 1983), числа Е-розеткообразующих клеток (Zaalberg, 1964). Исследование фагоцитарной активности лейкоцитов осуществляли одновременно в 4-х вариантах: 1) спонтанном - в отношении контрольного эритроцитарного диагностикума; 2) специфическом - в отношении хламидийного эритроцитарного диагностикума; 3) стимулированном с использованием контрольного эритроцитарного диагностикума; 4) стимулированном с использованием хламидийного эритроцитарного диагностикума. В качестве стимулятора применяли зимозан в концентрации 12 мкг/мл, приготовленный по методу Л. РШешег и соавт. (1956). Учет реакции выполняли с помощью светового микроскопа Биолам-17. Подсчет общего числа фагоцитировавших клеток и дифференцированный учет фагоцитарной активности

нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов осуществляли согласно рекомендациям Ю.И. Шилова (1998), вычисляя для каждой популяции клеток относительные и абсолютные величины фагоцитарного числа (ФЧ), процента фагоцитоза (ПФ), а также фагоцитарный индекс (ФИ), индекс специфичности (ИС), предложенный В.Н. Кашшныш (1993), и индекс нагрузки (ИН), предложенный автором. Иммунологические показатели оценивали до инфицирования и на 4, 7, 14, 21, 28-30 и 60-е сутки после заражения морских свинок.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили методами вариационной статистики (Ашмарин, Воробьев, 1962). Оценивали средние значения и стандартные отклонения показателей, достоверность различий (p), используя χ^2 -критерий Стьюдента, а также показатели связи, используя коэффициент корреляции (r). Различия считали значимыми при $p < 0,05$, показатели связи - при $r > 0,3$. Обработку цифрового материала проводили с помощью компьютера, используя пакет программы Microsoft Excel

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Воспроизведение экспериментального хламидиоза у морских свинок

Установлено, что внутрибрюшинное введение морским свинкам всех использованных доз *C. psittaci* индуцирует развитие генерализованного инфекционного процесса, что подтверждается индикацией патогена в различных органах с помощью РНИФ, биологического метода, а также гистологическими исследованиями. Как видно из табл. 1, период максимальной диссеминации возбудителя приходится на 7-14-е сутки после заражения экспериментальных животных. В дальнейшем наблюдается частичная элиминация патогена. На 28-е сутки в большинстве исследованных органов сохраняются единичные клетки *C. psittaci*.

По нашим данным, доза инфекта 10^4 LD₅₀ обуславливает быструю генерализованную диссеминацию возбудителя в течение первой недели после заражения, развитие выраженной альтерации и экссудации в сосудах и строме большинства исследованных органов, истощение В-зон лимфоидной ткани к 14-м, а Т-зон к 21-м суткам и последующую стимуляцию пролиферативных процессов со склерозированием тканей лимфоузлов и тимуса. Дозы 10^3 и 10^2 LD₅₀ вызывают менее интенсивную, но более продолжительную диссеминацию возбудителя, обеспечивающую уменьшение выраженности и увеличение длительности всех фаз воспаления. Полученные данные свидетельствуют о снижении элиминирующей функции и формировании персистентной хламидийной инфекции. Доза 10^1 LD₅₀ обуславливает низкий уровень диссеминации хламидий и адекватную ответную реакцию организма хозяина, способствующую элиминации патогена и восстановлению морфологической картины большинства исследованных органов уже к 21-м суткам.

**Индикация хламидий в органах морских свинок
в различные сроки после введения инфе́кта**

Доза инфекта	Исследованные органы	Уровень накопления хламидий в органах в различные сроки наблюдения, сут				
		4	7	14	21	28
10^4 LD ₅₀	Бры́жеечные лимфоузлы	++ ^н	++++ ^н	++/+++ ^н	+/?	±
	Тимус	+	++	+	+	-
	Селезенка	++ ^н	++++ ^н	+/? ^н	+/?	+
	Печень	+	+/?	++	++	+
	Надпочечник	+/?	+++	+	±	-
10^3 LD ₅₀	Бры́жеечные лимфоузлы	+/? ¹	+++ ^н	++/+++ ^н	++/+++	+ ³
	Тимус	+	++	++	++	±
	Селезенка	+/? ²	++ ^н	+ ¹	++	+
	Печень	+	++	++/+++	++	+
	Надпочечник	±	+/?	++	++	++
10^2 LD ₅₀	Бры́жеечные лимфоузлы	+/? ¹	++/+++ ^н	++/+++ ²	++	+ ³
	Тимус	±	+/?	+/?	+/?	±
	Селезенка	+ ³	++ ³	++ ³	+/?	+
	Печень	±	+/?	+/?	+/?	+
	Надпочечник	±	+/?	+/?	+/?	++
10^1 LD ₅₀	Бры́жеечные лимфоузлы	+ ³	++ ³	++ ³	+	+
	Тимус	±	+/?	+/?	+	±
	Селезенка	±/+ ³	+/? ³	++ ³	++	+
	Печень	±	+	++	++	+/?
	Надпочечник	±	+	+	+	±

Примечание. Результаты РНИФ оценивали по 4-х крестной системе: ++++ - не менее 100 хламидий в поле зрения с очень яркой флуоресценцией, +++ - не менее 50 хламидий в поле зрения с яркой флуоресценцией, ++ - не менее 20 хламидий в поле зрения с удовлетворительной флуоресценцией, + - единичные хламидии в поле зрения с крайне слабой флуоресценцией; ± - плохо различимая флуоресценция единичных хламидий; - отсутствие патогена. 1, 2 и 3 указывают, с какого пассажа на белых мышах был выделен жизнеспособный возбудитель из бры́жеечных лимфоузлов и селезенок морских свинок, и - после первичного введения инфе́кта.

Установлена прямая зависимость между интенсивностью диссеминации хламидий, выраженностью патоморфологических изменений в периферических и в центральных органах иммунной системы и дозой инфекта. При введении условно-высокой дозы *C. psittaci* выявлена прямая корреляция между уровнем диссеминации патогена и количеством фагоцитов и обратная - между концентрацией хламидий в органах и числом лимфоцитов, а при введении условно-низкой дозы - наоборот. Полученные данные могут указывать на формирование различных типов иммунного ответа при введении указанных доз хламидий.

Динамика основных гуморальных факторов естественной резистентности организма при экспериментальном хламидиозе

Анализ динамики уровней гуморальных факторов естественной резистентности экспериментальных животных показал, что на 7-14-е сутки после заражения (в период максимальной диссеминации возбудителя, выраженных процессов альтерации и экссудации в органах) происходит активация лизоцима, тромбоцитарного катионного белка и системы комплемента. В ходе пролиферативной фазы воспалительного процесса сохраняется высокая активность тромбоцитарного катионного белка и комплемента (рис. 1).

Выявлены различия по характеру и интенсивности воздействия использованных доз патогена на исследуемые показатели. Показано, что условно-высокая доза хламидий обуславливает мощную генерализованную диссеминацию возбудителя, выраженную альтерацию и экссудацию в органах в течение 7 суток после заражения, значительную активацию макрофагов, фибробластов и ретикулоцитов, трансформацию лимфоцитов в бласты и плазматиты, повышение уровня лизоцима до $20,82 \pm 1,21$ мкг/мл, тромбоцитарного катионного белка - до $50,41 \pm 13,74\%$, комплемента - до $115,40 \pm 22,10$ гем.ед., что соответственно в 1,3, 1,5 и 2 раза достоверно ($p < 0,05$) выше, по сравнению с контролем. По нашим данным, клеточная кооперация и реализация фагоцитами, В- и Т-лимфоцитами эффекторных функций способствуют апоптозу дефектных и инфицированных клеток, снижению их числа к 14-21-м суткам после заражения экспериментальных животных, усилению альтерации, экссудации и последующему фиброзированию лимфоидной ткани, что усугубляет нарушение дренажной функции органов. При этом отмечается сохранение высоких уровней тромбоцитарного катионного белка и комплемента и снижение активности лизоцима в сыворотке крови (параллельно числу макрофагов в органах). Длительное увеличение уровней указанных факторов можно объяснить освобождением их из инфицированных клеток хозяина в результате гибели. К 30-м суткам хламидий в большинстве исследованных органов отсутствуют, уровни лизоцима и комплемента достигают исходных значений.

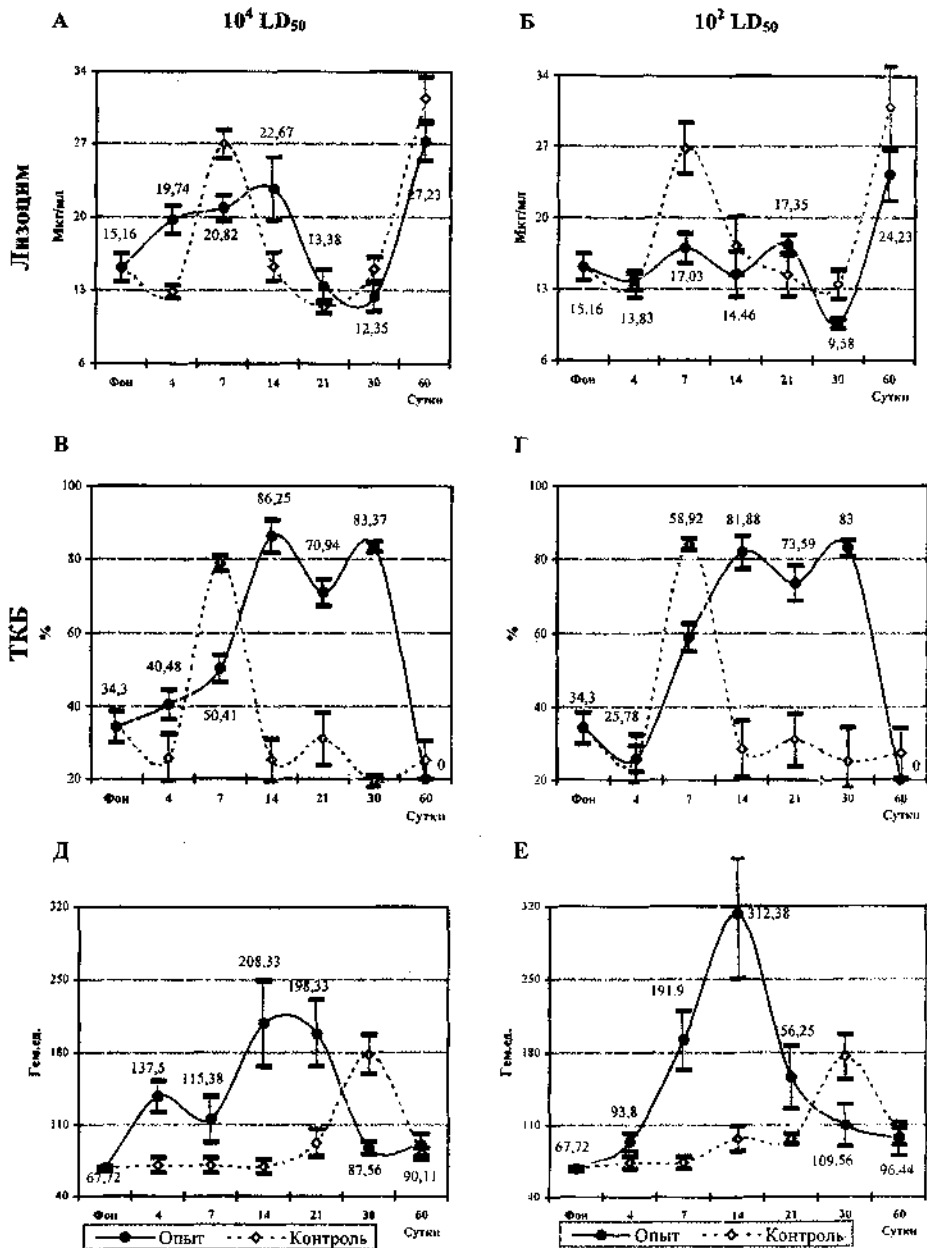


Рис. 1. Динамика уровня лизоцима (А, Б), тромбоцитарного катионного белка (В, Г) и комплемента (Д, Е) в сыворотках крови морских свинок, зараженных дозами 10^4 и 10^2 LD_{50} .

Согласно данным проведенного гистологического исследования, это обусловлено сохранением элиминирующей функции селезенки, печени и легких. К концу срока наблюдения выявлено угнетение активности тромбоцитарного катионного белка. Условно-низкая доза инфекта обуславливает менее интенсивную, но более продолжительную диссеминацию патогена, уменьшение выраженности и увеличение длительности всех фаз воспалительного процесса в органах, небольшое повышение числа макрофагов и уровня лизоцида, выраженную активацию тромбоцитарного катионного белка и комплемента у морских свинок. Кроме того, нами установлено снижение содержания в сыворотке крови инфицированных животных лизоцима к 30-м ($p > 0,05$), а тромбоцитарного катионного белка - к 60-м суткам после заражения ($p < 0,05$).

Установлена прямая корреляция между динамикой уровня лизоцима и числом клеток фагоцитарного ряда, а также между активностью комплемента и тромбоцитарного катионного белка, количеством лимфоцитов и концентрацией хламидий в органах морских свинок ($r > 0,3$). Полученные данные свидетельствуют о целесообразности исследования состояния основных факторов естественной резистентности организма при хламидийных инфекциях в связи с высоким дифференциальным и прогностическим значением.

Динамика уровня специфических антител в сыворотке крови

Для оценки влияния хламидий на В-звено иммунной системы морских свинок использовали комплекс однонаправленных серологических реакций - реакцию непрямой гемагглютинации (РИГА), реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию непрямого связывания комплемента (РНСК) и РНИФ, отражающих характер антителиобразования в динамике развития хламидийной инфекции (рис. 2).

Анализ полученных результатов свидетельствует о низком уровне продукции гемагглютининов, повышенные титры которых отмечаются лишь в период выраженных деструктивных процессов в организме.

Как видно из рис. 2, инфект в дозе 10^4 LD₅₀ потенцирует синтез специфических иммуноглобулинов, выявленных в РСК, в течение первых двух недель после введения. В дальнейшем происходит снижение уровня комплементсвязывающих антител, которое коррелирует с угнетением формирования В-зон лимфоидной ткани, их опустошением и склерозированием. В то же время доза 10^6 LD₅₀ обуславливает низкий уровень выработки комплементсвязывающих антител. Динамика уровня хламидийных антител, выявленных в РНСК, носит волнообразный характер. На 4-7- и 21-е сутки наблюдается повышение титров неполных антител, а на 14- и 30-е сутки - снижение.

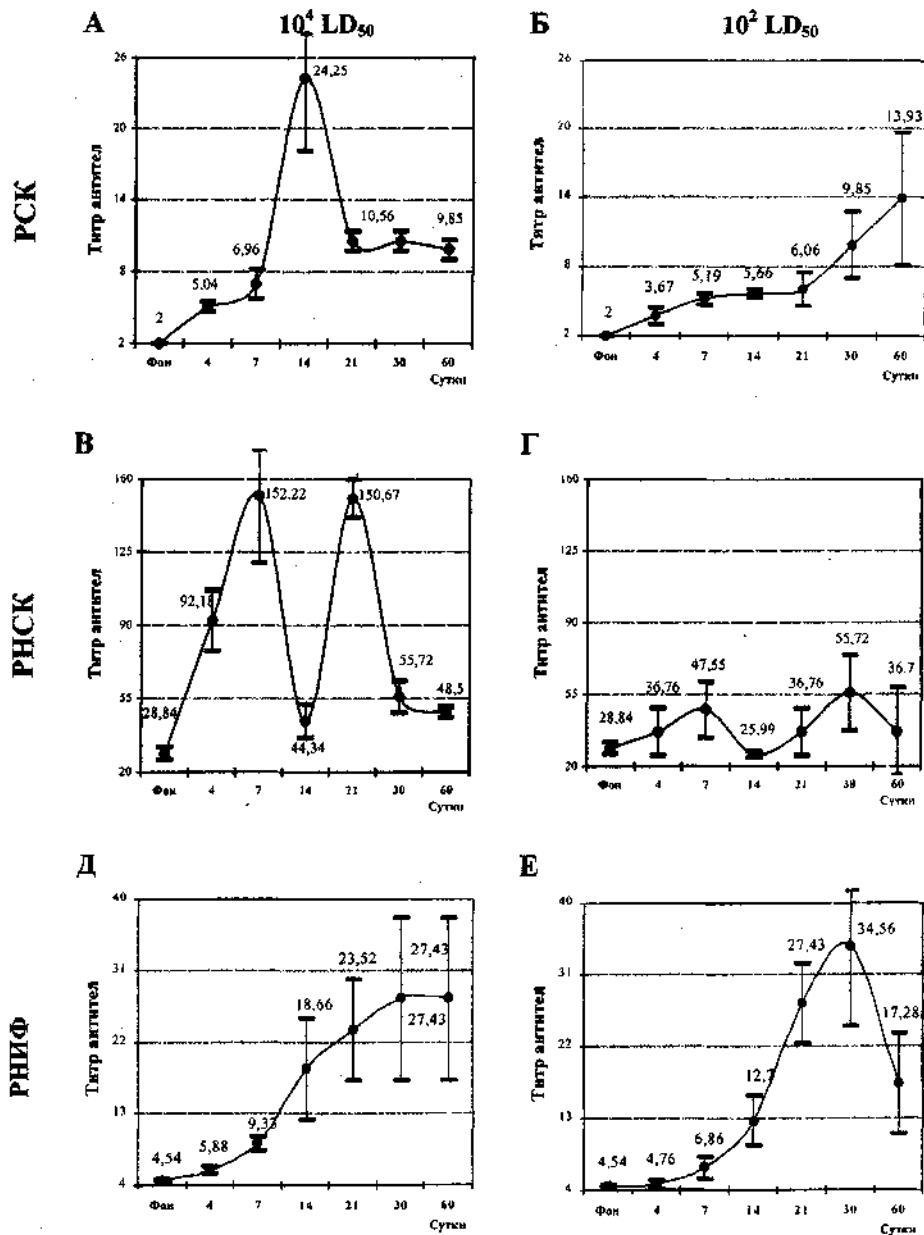


Рис. 2. Динамика уровней хламидийных антител, представленных в виде обратных величин, в РСК (А, Б), РНСК (В, Г) и РНИФ (Д, Е) в сыворотках крови морских свинок, зараженных дозами 10^4 и 10^2 LD₅₀-

По нашим данным, динамика уровня хламидийных антител, выявленных в РНСК, коррелирует с таковой циркулирующих иммунных комплексов ($r > 0,3$).

По результатам сравнительного исследования динамики уровней специфических антител в РСК и РНСК, нами обнаружена обратная зависимость между указанными показателями, выраженная в виде индекса экранирования (ИЭ) хламидийных антигенов:

$$\text{ИЭ} = \frac{\text{обратная величина титра комплементсвязывающих антител}}{\text{обратная величина титра неполных антител}}$$

Установлено, что преобладание выработки полных комплементсвязывающих антител и повышение значений индекса экранирования до 1 и выше коррелирует со снижением концентрации хламидий в органах морских свинок, что может служить критерием эффективности гуморального иммунного ответа. Напротив, преобладание выработки неполных антител и значения индекса экранирования ниже 1 предполагают формирование дефектов системы комплемента и В-клеточного звена иммунной системы.

Как видно из рис. 2, максимальное повышение уровня хламидийных антител, выявленных в РНИФ, наблюдается на 21-30-е сутки с момента инфицирования, что сопровождается элиминацией возбудителя из большинства исследованных органов. Полученные данные могут указывать на высокую протективную активность данных антител.

Таким образом, изучаемые показатели отражают степень резистентности организма к хламидийной инфекции и могут иметь прогностическое значение.

Динамика фагоцитарной активное™ лейкоцитов крови

Исследование суммарной и дифференцированной фагоцитарной активности лейкоцитов (ФАЛ) в отношении контрольного и хламидийного эритроцитарных диагностикумов у инфицированных морских свинок выявило раннюю и интенсивную стимуляцию фагоцитарного звена иммунной системы в ответ на внутрибрюшинное введение хламидий (табл. 2, рис. 3). По нашим данным, на 7-е сутки отмечается угнетение фагоцитарной активности лейкоцитов, которое носит поликлональный характер, и регистрируется, в большей степени, по показателям относительных величин. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении процессов дифференцировки и созревания фагоцитов, а также декомпенсации «неспецифических» механизмов поддержания иммунного гомеостаза у экспериментальных животных. Это способствует диссеминации возбудителя практически во все органы морских свинок. Как видно из представленного материала, дальнейшая (с 14-х суток) активация фагоцитов носит преимущественно специфический характер и коррелирует с динамикой уровня хламидийных антител ($r > 0,3$).

Установлена прямая корреляция между уровнями хламидийных антител, выявленных в РИГА, РСК, РНИФ, и значениями показателей фагоцитарной активности нейтрофилов и

Динамика показателей фагоцитарной активности лейкоцитов у морских свинок при экспериментальной хламидийной инфекции

Виды ФАЛ	Показатели	Единицы измерения	Средний уровень показателей в разные сроки наблюдения (сут) в отношении эритроцитарных диагностикумов:							
			контрольного				хламидийного			
			Фон	4	7	14	Фон	4	7	14
Суммарная	ФЧ	Усл.ед. $\times 10^6$ кл/л	0,06±0,00 0,21±0,02	0,32±0,03 1,97±0,19***	0,03±0,00 0,32±0,04	0,21±0,04 1,05±0,36**	0,13±0,01 0,44±0,05	0,64±0,04 3,86±0,52***	0,05±0,01 0,54±0,07	0,81±0,28 4,33±1,05**
	ПФ	% $\times 10^9$ кл/л	8,26±0,61 3,30±0,54	25,47±1,64*** 16,09±1,63***	2,75±0,19* 2,89±0,24	14,80±1,85** 8,04±2,11**	15,32±1,12 5,66±0,84	41,27±1,92*** 25,30±2,78***	4,28±0,26 4,12±0,28	36,90±7,19** 21,20±5,86**
	ФИ	Усл.ед.	1,07±0,03	1,22±0,03***	1,00±0,00*	1,20±0,06**	1,16±0,08	1,47±0,05***	1,07±0,02**	1,67±0,15
Нейтрофилов	ФЧ	Усл.ед. $\times 10^6$ кл/л	0,06±0,00 0,07±0,02	0,32±0,03 1,83±0,19***	0,03±0,00 0,23±0,03	0,17±0,03 0,87±0,17**	0,13±0,01 0,37±0,05	0,65±0,04 3,74±0,52***	0,05±0,01 0,44±0,10	0,77±0,28 3,99±1,05**
	ПФ	% $\times 10^9$ кл/л	8,28±0,64 2,89±0,46	25,56±1,64*** 14,82±1,61***	2,65±0,19*** 2,21±0,23***	14,37±2,09** 7,48±1,43**	15,33±1,10 5,21±0,64	41,89±1,90*** 24,23±2,79***	4,29±0,27*** 3,41±0,31*	35,85±6,72** 19,00±4,46**
	ФИ	Усл.ед.	1,08±0,02	1,23±0,03*	1,00±0,00*	1,11±0,04	1,14±0,03	1,54±0,05***	1,07±0,02**	1,87±0,17*
Эозинофилов	ФЧ	Усл.ед. $\times 10^6$ кл/л	0,11±0,04 0,04±0,01	0,28±0,05 0,12±0,03***	0,08±0,02 0,09±0,02***	0,14±0,14 0,10±0,00**	0,21±0,05 0,07±0,01	0,31±0,06 0,12±0,03***	0,07±0,02 0,10±0,02***	0,45±0,28 0,20±0,09**
	ПФ	% $\times 10^9$ кл/л	14,29±0,00 0,41±0,00	22,42±3,41 1,04±0,27	8,09±2,34* 0,68±0,20*	7,14±7,00*** 0,07±0,07***	13,89±8,54 0,45±0,25	23,37±4,60 1,06±0,31	6,63±2,33 0,71±0,23	31,17±14,00 1,00±0,63
	ФИ	Усл.ед.	1,00±0,00	1,19±0,12	1,00±0,00*	2,00±0,00*	1,00±0,00	1,17±0,08**	1,00±0,00***	1,25±0,24
Моноцитов	ФЧ	Усл.ед. $\times 10^6$ кл/л	0,00±0,00 0,00±0,00	0,50±0,00 0,02±0,00	0,00±0,00 0,00±0,00	0,00±0,10 0,07±0,02	0,00±0,00 0,00±0,00	0,00±0,00 0,00±0,00	0,00±0,00 0,00±0,00	0,94±0,29 0,25±0,09
	ПФ	% $\times 10^9$ кл/л	0,00±0,00 0,00±0,00	50,00±0,00*** 0,23±0,00***	0,00±0,00* 0,00±0,00	22,10±5,60* 0,49±0,12*	0,00±0,00 0,00±0,00	0,00±0,00 0,00±0,00	0,00±0,00 0,00±0,00	51,05±10,27** 1,18±0,32**
	ФИ	Усл.ед.	0,00±0,00	1,00±0,00***	0,00±0,00	1,18±0,09***	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,63±0,20**

Примечание. *** - достоверное отклонение среднего уровня показателей от исходной величины при $p < 0,001$; ** - $p < 0,02$; * - $p < 0,05$.

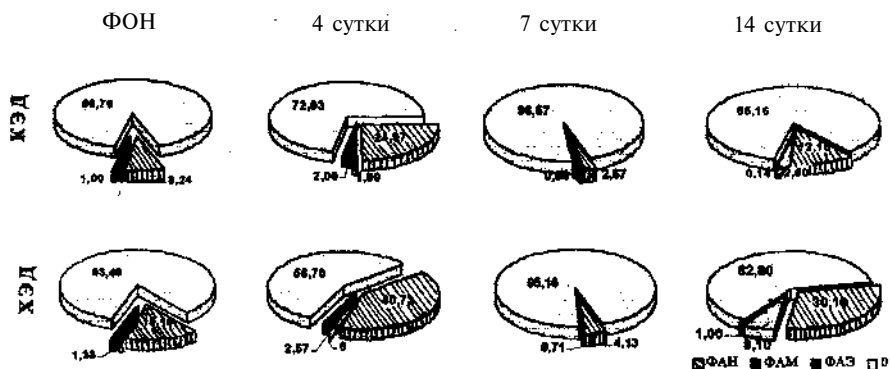
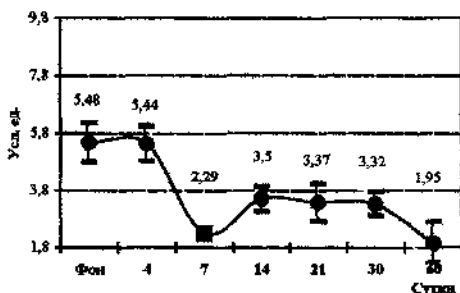


Рис.3. Динамика удельного вклада (%) в фагоцитарную активность разных популяций лейкоцитов у морских свинок при экспериментальном хламидиозе.

моноцитов (гХ),3). По нашим данным, повышение титров данных антител сопровождается снижением удельного вклада в фагоцитарную активность нейтрофилов и повышением - моноцитов. Как видно из табл. 2, динамика показателей фагоцитарной активности эозинофилов носит волнообразный характер и отражает вне* и внутриклеточные стадии жизненного цикла хламидий. Анализ показателей связи выявил обратную зависимость между уровнем хламидийных антител и значениями показателей фагоцитарной активности эозинофилов.

На рис. 4 представлены результаты изучения функционального состояния фагоцитов крови в НСТ-тесте. Нами обнаружено угнетение микробипидного потенциала циркулирующего пула лейкоцитов у морских свинок при экспериментальном хламидиозе.

А



Б

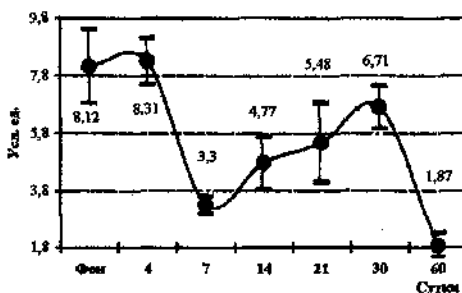


Рис. 4. Динамика значений спонтанного (А) и стимулированного (Б) вариантов НСТ-геста у морских свинок при экспериментальной хламидийной инфекции.

Анализ показателей связи выявил прямую корреляцию ($r > 0,3$) между уровнями фагоцитарного индекса и тромбоцитарного катионного белка, а также обратную зависимость между динамикой показателей суммарной фагоцитарной активности лейкоцитов и уровнями лизоцима и комплемента ($r < -0,3$). Полученные данные могут указывать на то, что активации фагоцитарных реакций лейкоцитов в течение первых жизненных циклов хламидий способствуют факторы естественной резистентности. Их недостаточность обуславливает угнетение функций фагоцитов, диссеминацию возбудителя и стимуляцию гуморального иммунного ответа - выработку антител-опсонинов. Начиная с 14 суток после заражения экспериментальных животных, фагоцитарная активность лейкоцитов приобретает специфический характер, что обусловлено вовлечением эффекторов клеточного иммунитета.

Исследование показателей резервной емкости фагоцитов в стимулированных вариантах фагоцитарного и НСТ-теста показало, что фагоциты чувствительны к стимуляторам в течение всего срока исследования, что свидетельствует о сохранении резервных возможностей фагоцитарной системы и целесообразности проведения соответствующей иммунокоррипующей терапии.

Коррекция иммунологических дефектов Тактивиним и ганглиином

Как видно из результатов исследований, представленных выше, хламидий оказывают ингибирующее влияние на факторы естественной и специфической резистентности организма, что подтверждает представление о них как о цолшшоных иммунодепрессантах. В связи с этим для коррекции дефекта Т-клеточного звена иммунной системы инфицированных морских свинок мы использовали Тактивин, а фагоцитарного и В-клеточного звеньев - ганглиин. Результаты комплексной оценки иммуномодулирующей активности 3,6 и 10 доз препаратов представлены на рис. 5 в виде пунктирных линий.

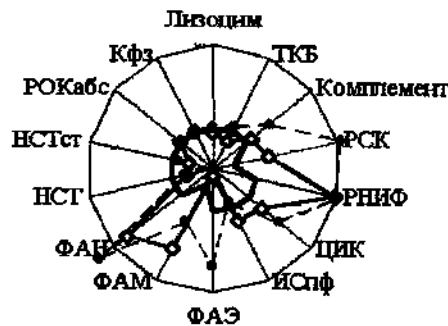
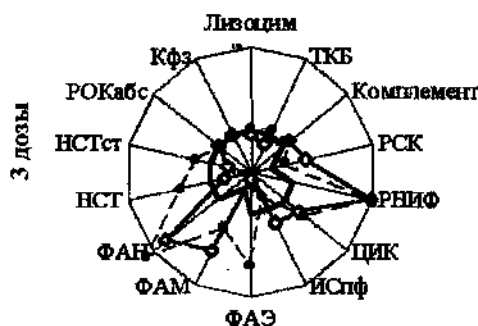
После введения трех доз Тактивина регистрируется стимуляция преимущественно системы естественной резистентности организма: увеличение уровня тромбоцитарного катионного белка, поглотительной и микробицидной активности гранулоцитов. Отмечается снижение показателей фагоцитарной активности моноцитов, уровня комплементсвязывающих антител и индекса специфичности фагоцитарного теста. Шестикратное введение препарата обуславливает стимуляцию Т-лимфопоэза, поглотительной и микробицидной активности нейтрофилов и снижение индекса специфичности фагоцитарного теста. Десятикратное введение Тактивина способствует активации тромбоцитарного катионного белка, комплемента, фагоцитарной активности гранулоцитов, микробицидного потенциала лейкоцитов в НСТ-тесте, снижению индекса специфичности фагоцитарного теста.

Тактивин

Ганглиин

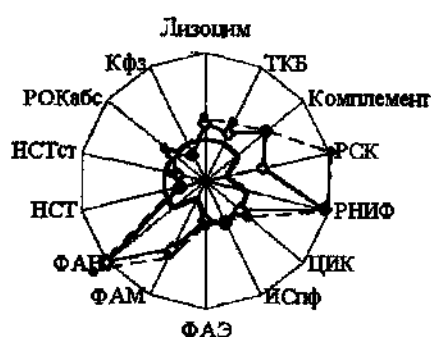
А

Г



Б

Д



В

Е

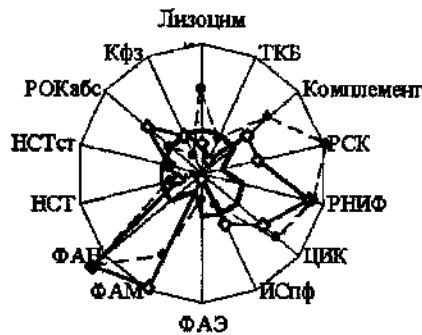
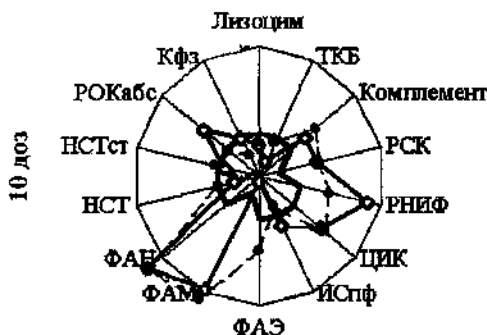


Рис. 5. Интегральная оценка иммуномодулирующего влияния Тактивина (А, Б, В) и ганглиина (Г, Д, Е) в условиях экспериментальной хламидийной инфекции.

Установлено, что уровни большинства депрессированных иммунологических показателей под влиянием Тактивина достигают исходной величины.

После введения трех доз ганглиина регистрируется стимуляция факторов как естественной (тромбоцитарный катионный белок, комплемент, фагоцитарная активность гранулоцитов), так и специфической (комплемента-связывающие антитела, циркулирующие иммунные комплексы) резистентности организма. Отмечается снижение фагоцитарной активности моноцитов, по сравнению с контролем, и индекса специфичности фагоцитарного теста, что указывает на нивелирование специфического характера клеточных иммунных реакций и повышение протективной активности синтезируемых хламидийных антител. Шестикратное примирование ганглиина обуславливает стимуляцию фагоцитарной активности нейтрофилов, В- и Т-звеньев. Десятикратное введение препарата способствует активации преимущественно гуморальных факторов как естественной, так и специфической резистентности морских свинок, а именно: активации лизоцима, тромбоцитарного катионного белка, комплемента, увеличению уровней комплемента-связывающих антител и циркулирующих иммунных комплексов. Установлено модулирующее влияние препарата на клеточное звено иммунитета. Уровни большинства его показателей достигают исходной величины.

По нашим данным, введение препаратов Тактивина и ганглиина морским свинкам до заражения способствует стимуляции системы естественной резистентности организма и отмене ингибирующего действия хламидий на поглотительную и микробицидную активность фагоцитов на 7-е сутки после заражения.

Анализ экспериментальных данных свидетельствует о перспективности применения Тактивина и ганглиина в качестве средств патогенетической терапии и профилактики хламидиозов.

Практические рекомендации

1. Комплексное изучение показателей основных факторов естественной и специфической резистентности организма, функций и резервной емкости фагоцитов в стимулированных вариантах фагоцитарного и НСТ-теста при хламидиозе позволяет прогнозировать характер течения заболевания, формирование иммуносупрессии соответствующих звеньев и определять тактику иммунокорригирующей терапии.
2. Интегральная оценка активности иммуномодуляторов весьма информативна для определения спектра и эффективности применения средств патогенетической терапии.
3. Учитывая различные механизмы воздействия Тактивина и ганглиина на фагоцитарную активность лейкоцитов и процесс антителообразования, рекомендуется дифференцированное использование данных иммуномодуляторов у больных хламидиозами.

В Ы В О Д Ы

1. Показано, что виаурибрюпшинное заражение морских свинок овокультуры *Chlamydomphila psittaci* индуцирует развитие генерализованного инфекционного процесса в виде острой (10^4 LDso), хронической ($1Q^3 - 10^2$ LDso) и латентной (10^1 LDJO) форм. Степень истощения и склерозирования лимфоидной ткани зависит от дозы патогена.

2. Выявлены различия по характеру и интенсивности воздействия использованных доз хламидий на основные факторы естественной резистентности организма. Установлена прямая корреляция между динамикой уровня лизоцима и числом клеток фагоцитарного ряда, а также между активностью комплемента, тромбоцитарного катионного белка, количеством лимфоцитов и концентрацией хламидий в органах морских свинок. Отмечена целесообразность исследования состояния основных факторов естественной резистентности организма при хламидийных инфекциях в связи с высоким прогностическим значением.

3. Показано, что преобладание выработки полных комплементсвязывающих антител и повышение значений индекса экранирования до 1 и выше коррелирует со снижением концентрации хламидий в органах морских свинок, что может служить критерием эффективности гуморального иммунного ответа. Преобладание выработки неполных антител и значения индекса экранирования ниже 1 предполагают формирование дефектов системы комплемента и В-клеточного звена иммунной системы. Отмечено, что существенное повышение уровня хламидийных антител, выявленных в РНИФ, сопровождается элиминацией возбудителя из большинства исследованных органов, что может указывать на высокую протективную активность данных антител.

4. Факторы естественной резистентности организма способствуют активации фагоцитарных реакций лейкоцитов в течение первого жизненного цикла хламидий. Их недостаточность обуславливает угнетение микробицидных функций фагоцитов, диссеминацию возбудителя и стимуляцию гуморального иммунного ответа, в частности, выработку антител-опсонинов. Начиная с 14-х суток после заражения, фагоцитарная активность лейкоцитов приобретает специфический характер, что обусловлено вовлечением эффекторов клеточного иммунитета.

5. Предложен алгоритм оценки иммунного статуса при хламидиозе, который позволяет прогнозировать характер течения заболевания, формирование иммуносупрессии соответствующих звеньев и определять тактику иммунокорректирующей терапии.

6. Установлено, что применение препаратов Тактивина и ганглиина перспективно для иммунокоррекции хламидийной инфекции. Учитывая различные механизмы их воздействия на фагоцитарную активность лейкоцитов и процесс антителообразования, целесообразно дифференцированное использование данных иммуномодуляторов при хламидиозах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ширинкина Н.В., Тимашева О.А., Петров В.Ф. К вопросу оценки некоторых факторов неспецифической резистентности при хламидийных инфекциях//В кн.: Современная вакцинология: Тез докл. П-й Мевдунар. конф., посвященной 100-летию Пермского НПО «Биомед». - Пермь, 1998. - С. 174.
2. Ширинкина Н.В., Тимашева О.А. Изучение иммунного статуса на фоне экспериментальной инфекции, индуцированной *Chlamydia psittaci*//В кн.: Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: Матер. Всерос. научн. конф., посвященной 95-летию Уфимского НИИВС им. И.И. Мечникова ГУП «Иммунопрепарат». - Уфа, 2000. - Т. 1. - С. 230-233.
3. Ширинкина Н.В., Оборина Л.И., Тимашева О.А. Влияние хламидийного иммуногена на некоторые иммунологические показатели у морских свинок// Там же. - С. 235-238.
4. Ширинкина Н.В., Тимашева О.А. Изучение влияния иммуномодулирующей терапии на клеточное и гуморальное звено иммунной системы морских свинок при экспериментальном хламидиозе//В кн.: Перспективы развития естественных наук в высшей школе: Труды Междунар. научн. конф.- Пермь: ПТУ, 2001. - Т. 4. - С. 215-219.
5. Четвертных В.А., Черепшев В.А., Горовиц Э.С., Тимашева О.А., Ширинкина Н.В. Реакции иммунной системы при экспериментальном хламидиозе. Сообщение 1. Динамика гуморального иммунного ответа//Аллергия, астма, клиническая иммунология. - 2001.-N. 4.-С. 3-7.
6. Ширинкина Н.В., Тимашева О.А. Изучение динамики основных факторов естественной и специфической резистентности у морских свинок при экспериментальной хламидийной инфекции. Сообщение 1. Оценка гуморальных факторов естественной резистентности организма/ТВ кн.: Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в 21 веке: Матер. Всерос. конф., посвященной 105-летию Пермского НИИ вакцин и сывороток ФГУП «Пермское НПО «Биомед». - Пермь, 2003. - С. 199-202.
7. Ширинкина Н.В., Тимашева О.А. Изучение динамики основных факторов естественной и специфической резистентности у морских свинок при Экспериментальной хламидийной инфекции. Сообщение 2. Оценка уровней хламидийных антител в динамике инфекционного процесса//Там же. - С. 203-207.

Ширинкина Наталья Васильевна

**ФАКТОРЫ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, ПОКАЗАТЕЛИ
ИММУННОГО ОТВЕТА И ТАКТИКА ИММУНОКОРРЕКЦИИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ**

АВТОРЕФЕРАТ

Лицензия ОД № 18-0143 от 05.11.2001

Подписано в печать 12.05.2003. Тираж 110 экз. Уч. изд. л 1,0.

Формат 60x84/16. Набор компьютерный. Заказ №. 557/2003

Отпечатано на ризографе

в отделе Электронных издательских систем ОЦНИТ

Пермского государственного технического университета
614600, г. Пермь, Комсомольский пр., 29а, к.113, т. (3422) 198033